

Chlamydia trachomatis : identifying women with tubal factor subfertility

Citation for published version (APA):

den Hartog, J. E. (2010). *Chlamydia trachomatis : identifying women with tubal factor subfertility*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.
<https://doi.org/10.26481/dis.20100616jh>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20100616jh](https://doi.org/10.26481/dis.20100616jh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Chlamydia (C.) trachomatis is the most prevalent sexually transmitted disease in industrialized countries, affecting 35 000 women in the Netherlands each year. Because most women do not experience symptoms and, therefore, do not receive antibiotic treatment, *C. trachomatis* infections may ascend to the upper genital tract and may persist for many years, increasing the risk of late complications. Up to 4.6% of women with *C. trachomatis* lower genital tract infections will eventually develop tubal factor subfertility. The reference standard for diagnosing tubal pathology in subfertile women is laparoscopy with tubal testing. In order to prevent exposure to invasive tubal testing of all subfertile women, screening methods — comprising serological testing and hysterosalpingography (HSG) — are used to discern subfertile women with a high and low risk of tubal pathology, respectively.

An introduction to the subject, as well as the outline of this thesis, was provided in **Chapter 1**. The first aim of this thesis was to optimize the screening strategy for diagnosing persistent *C. trachomatis* infections and the ensuing tubal pathology in subfertile women. The second aim was to study the immunogenetic contribution to persistence of *C. trachomatis* infections. The third aim was to assess different test methods to detect persistent *C. trachomatis* infections in endometrial tissue of subfertile women.

Persistent *C. trachomatis* infections are assumed to be important risk factors for tubal pathology. In **Chapters 2** and **3**, several serological markers of persistence were studied in a cohort of 313 subfertile women, who all underwent laparoscopy with tubal testing to assess the tubal status. Besides the currently used screening test [*C. trachomatis* immunoglobulin (Ig) G antibody testing; CAT], IgG antibodies to chlamydia heat shock protein 60 (cHSP60) and to chlamydia lipopolysaccharide (LPS), IgA antibodies to *C. trachomatis* and high-sensitivity CRP (hs-CRP) were measured. The prevalence of tubal pathology — as defined as extensive peri-adnexal adhesions and/or distal occlusion of at least one tube at laparoscopy — was 18.8%. All serological markers of persistence were significantly more prevalent in women with tubal pathology as compared to those without tubal pathology. CAT remained the best single test [odds ratio (OR) 13.9]. Only the combination of CAT (as a marker of a previous *C. trachomatis* infection) and hs-CRP (as a marker of persistence) resulted in a significantly higher OR (39.7), and therefore this test combination is a candidate screening method in the fertility work-up.

In the same study cohort, the role of other *Chlamydiaceae* species in the development of tubal pathology was evaluated (**Chapter 3**). It was hypothesized that *C. pneumoniae* and *C. psittaci* contribute in the pathogenesis of tubal damage by eliciting a genus-specific auto-immune inflammatory response, but our findings could not support this hypothesis.

In **Chapter 4**, three different screening strategies (comprising CAT, hs-CRP and HSG) were explored in a population of 642 subfertile women who all underwent tubal testing (HSG and/or laparoscopy). The goal of this observational study was to develop a screening strategy which is able to accurately estimate the risk of tubal pathology in a non-invasive manner. Based on our findings, we proposed CAT as the first screening test for tubal pathology in subfertile women (risk of tubal pathology 14% in CAT-negative women and 53% in CAT-positive women, respectively). Hs-CRP seemed promising, and the value of HSG was shown to be limited. We suggested to omit laparoscopy in CAT-negative patients and in patients with normal or inconclusive HSGs, whereas in CAT-positive women and in women with abnormal HSGs, laparoscopy remains justified.

Variations in immunologically important host genes are assumed to result in an aberrant immune response against *C. trachomatis* infections, thereby increasing the risk of persistence and tubal pathology. **Chapter 5** described a *toll-like receptor* (TLR) 4 knockout mouse model and human candidate gene approach. In *TLR4* knockout mice, clearance of *C. trachomatis* infection and re-infection occurred slower as compared to *TLR4* wildtype mice, indicating a role of TLR4 in the immune response to *C. trachomatis* infections. In 614 women visiting a Sexually Transmitted Diseases outpatient clinic and in 259 subfertile women, carrying the *TLR4* +896 A>G single nucleotide polymorphism (SNP) did not play a significant role in susceptibility and outcome of *C. trachomatis* infections. However, *C. trachomatis* IgG-positive subfertile women with tubal pathology were more than twice as likely to be carriers of the mutant *TLR4* +896 G allele as compared to those without tubal pathology. This observation did not reach statistical significance. In conclusion, both the murine model and the human immunogenetics studies show a slight effect upon *TLR4* deficiency in the severity of infection but not in the susceptibility to infection.

In **Chapter 6**, negative results were found for the -260 C>T SNP in the gene encoding cluster of differentiation (CD) 14.

In **Chapter 7**, subsequently, a carrier trait analysis was performed, since we hypothesized that carrier traits (i.e. carrying multiple SNPs in multiple genes) that likely result in an aberrant immune response are associated with an increased risk of tubal pathology following a *C. trachomatis* infection. In 227 subfertile women, five variations in four genes encoding *C. trachomatis* receptors [TLR4, TLR9, CD14 and caspase recruitment domain (CARD) 15 / nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 2] were studied. The presence of two or more SNPs tended to corre-

late with an increased risk of tubal pathology following a *C. trachomatis* infection (73%) as compared to a lower number of SNPs (33%). An adequate recognition of *C. trachomatis* by receptors in the genital tract seems to be a relevant step in the immune response, and may play a role in protecting the host against the development of late sequelae following a *C. trachomatis* infection.

Persistent *C. trachomatis* infections do not only result in tubal pathology, but have also been associated with impaired implantation capacities due to persistent low-grade endometritis. **Chapter 8** comprised a pilot study using immunohistochemical staining methods and polymerase chain reaction (PCR) to detect *C. trachomatis* in the endometrium of subfertile women. In 40 subfertile women, no correlation was found between immunohistochemical staining results, CAT and tubal status. PCR results were negative in a random subset of endometrial samples ($n = 13$). Based on findings in literature, further research on this topic should be encouraged.

In **Chapter 9**, the present insight regarding persistent *C. trachomatis* infections and tubal factor subfertility, including the findings as described in this thesis and recommendations for further studies, were discussed.

Samenvatting

Chlamydia (C.) trachomatis is de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoening in ontwikkelde landen, en treft jaarlijks 35.000 vrouwen in Nederland. Aan gezien de meeste vrouwen geen symptomen hebben en dus niet behandeld worden met antibiotica, kunnen *C. trachomatis* infecties opstijgen naar de hogere tractus genitalis en gedurende vele jaren persisteren, waardoor het risico op late complicaties toeneemt. Tot 4.6% van de vrouwen met *C. trachomatis* infecties van de lagere tractus genitalis zal uiteindelijk tubapathologie en subfertiliteit ontwikkelen. De gouden standaard voor het vaststellen van tubapathologie bij subfertiele vrouwen is de laparoscopie met tubatesten. Teneinde niet alle subfertiele vrouwen bloot te stellen aan invasieve tubadiagnostiek, worden screeningstesten — zoals serologische testen of hysterosalpingografie (HSG) — gebruikt om een onderscheid te maken tussen subfertiele vrouwen met een hoog respectievelijk laag risico op tubapathologie.

Hoofdstuk 1 geeft een introductie van het onderwerp en een overzicht van het proefschrift. Het eerste doel van dit proefschrift was om de screeningsstrategie voor het vaststellen van persisterende *C. trachomatis* infecties en tubapathologie bij subfertiele vrouwen te optimaliseren. Het tweede doel was om de immunogenetische bijdrage aan persistentie van *C. trachomatis* infecties te bestuderen. Het derde doel was om verschillende testmethoden voor detectie van persisterende *C. trachomatis* infecties in het endometrium van subfertiele vrouwen te beoordelen.

Persisterende *C. trachomatis* infecties worden beschouwd als een belangrijke risicofactor voor tubapathologie. In **Hoofdstuk 2** en **3** werden diverse serologische markers van persistentie bestudeerd in een cohort van 313 subfertiele vrouwen, die allen een laparoscopie met tubatesten ondergingen om de tubastatus vast te stellen. Naast de momenteel gebruikte screeningstest [*C. trachomatis* immunoglobuline (Ig) antistof test; CAT], werden IgG antistoffen tegen chlamydia heat shock protein 60 (cHSP60) en tegen chlamydia lipopolysaccharide (LPS), IgA antistoffen tegen *C. trachomatis* en het hoog-sensitieve CRP (hs-CRP) gemeten. De prevalentie van tubapathologie — gedefinieerd als uitgebreide adhesies rondom de adnexa en/of distale occlusie van tenminste één tuba bij laparoscopie — was 18.8%. Alle serologische markers van persistentie waren significant vaker aantoonbaar bij vrouwen met tubapathologie ten opzichte van vrouwen zonder tubapathologie. CAT bleef de beste enkele test [odds ratio (OR) 13.9]. Alleen de combinatie CAT (als marker van

een eerdere *C. trachomatis* infectie) en hs-CRP (als marker van persistentie) resulteerde in een significant hogere OR (39.7), en daarom is deze testcombinatie een potentiële screeningsmethode voor in het fertiliteitsonderzoek.

Verder werd de rol van andere *Chlamydiaceae* species in de ontwikkeling van tubapathologie geëvalueerd in **Hoofdstuk 3**. De hypothese was dat *C. pneumoniae* en *C. psittaci* bijdragen aan de pathogenese van tubapathologie door een genus-specifieke auto-immuun ontstekingsrespons teweeg te brengen, maar onze bevindingen konden deze hypothese niet ondersteunen.

In **Hoofdstuk 4** werden drie verschillende screeningsstrategieën (bestaande uit CAT, hs-CRP en HSG) onderzocht in een populatie van 642 subfertiele vrouwen die allen tubatesten (HSG en/of laparoscopie) hadden ondergaan. Het doel van deze observationele studie was om een screeningsstrategie te ontwikkelen die in staat is om op accurate en niet-invasieve wijze het risico op tubapathologie in te schatten. Gebaseerd op onze bevindingen, stelden wij CAT voor als eerste screeningstest voor tubapathologie bij subfertiele vrouwen (risico op tubapathologie respectievelijk 14% bij CAT-negatieve vrouwen en 53% bij CAT-positieve vrouwen). Hs-CRP leek veelbelovend, en de waarde van het HSG bleek beperkt. Wij stelden voor om bij CAT-negatieve vrouwen en vrouwen met normale of inconclusieve HSG's geen laparoscopie meer te verrichten, terwijl de laparoscopie wel verdedigbaar blijft bij CAT-positieve vrouwen of vrouwen met een afwijkend HSG.

Variaties in immunologisch belangrijke gastheergenen worden verondersteld te resulteren in een afwijkende immuunrespons tegen *C. trachomatis* infecties, waardoor het risico op persistentie en tubapathologie toeneemt. **Hoofdstuk 5** beschreef een *toll-like receptor (TLR) 4 knockout* muismodel en een humaan kandidaat-gen model. In *TLR4 knockout* muizen werden *C. trachomatis* infectie en re-infectie langzamer geklaard ten opzichte van *TLR4 wildtype* muizen, wat duidt op een rol van TLR4 in de immuunrespons tegen *C. trachomatis* infecties. Zowel bij 614 vrouwen die een Seksueel Overdraagbare Aandoeningen-polikliniek bezochten als bij 259 subfertiele vrouwen speelde dragerschap van de *TLR4* +896 A>G *single nucleotide polymorphism* (SNP) geen significante rol in vatbaarheid en beloop van *C. trachomatis* infecties. *C. trachomatis* IgG-positieve subfertiele vrouwen met tubapathologie waren twee keer zo vaak drager van het mutante *TLR4* +896 G allel ten opzichte van degenen zonder tubapathologie. Deze bevinding was niet statistisch significant. Concluderend tonen zowel het muismodel als de humane immunogenetische studies aan dat *TLR4* deficiëntie enig effect heeft op de ernst van de infectie, maar niet op de vatbaarheid voor de infectie.

In **Hoofdstuk 6** werden negatieve resultaten gevonden voor de -260 C>T SNP in het gen coderend voor *cluster of differentiation (CD) 14*.

In **Hoofdstuk 7** werd vervolgens een *carrier trait* analyse verricht, aangezien we veronderstelden dat *carrier traits* (dat wil zeggen dragerschap van meerdere SNP's

in meerdere genen), die waarschijnlijk leiden tot een afwijkende immuunrespons, geassocieerd zijn met een verhoogd risico op tubapathologie na een *C. trachomatis* infectie. Vijf variaties in vier genen coderend voor *C. trachomatis* receptoren [TLR4, TLR9, CD14 en *caspase recruitment domain* (CARD) 15 / *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) 2] werden bestudeerd bij 227 subfertiele vrouwen. De aanwezigheid van twee of meer SNP's leek te correleren met een verhoogd risico op tubapathologie na een *C. trachomatis* infectie (73%) ten opzichte van minder dan twee SNP's (33%). Een adequate herkenning van *C. trachomatis* door receptoren in de tractus genitalis lijkt een belangrijke stap in de immuunrespons te zijn, en zou een rol kunnen spelen bij het beschermen van de gastheer tegen de ontwikkeling van late gevolgen na een *C. trachomatis* infectie.

Persisterende *C. trachomatis* infecties leiden niet alleen tot tubapathologie, maar zijn ook geassocieerd met een verstoord implantatievermogen ten gevolge van een persisterende *low-grade* endometritis. **Hoofdstuk 8** bestaat uit een *pilot* studie, waarbij immunohistochemische kleuringen en *polymerase chain reaction* (PCR) zijn gebruikt om *C. trachomatis* aan te tonen in het endometrium van subfertiele vrouwen. Bij 40 subfertiele vrouwen werd geen correlatie gevonden tussen de resultaten van immunohistochemische kleuringen, CAT en tubastatus. PCR uitslagen waren negatief in een willekeurige subgroep van endometriumbiopsen ($n = 13$). Gebaseerd op bevindingen in de literatuur zou verder onderzoek over dit onderwerp aan te moedigen zijn.

In **Hoofdstuk 9** werden de huidige inzichten in persisterende *C. trachomatis* infecties en subfertiliteit ten gevolge van tubapathologie, inclusief de bevindingen zoals beschreven in dit proefschrift en aanbevelingen voor toekomstig onderzoek, besproken.